



D. Clarençon, E. Multon, M. Galonnier, M. Estrade, C. Fournier,  
J. Mathieu, J.C. Mestries, G. Testylier and M. Fatôme

**RÉSUMÉ** – L'irradiation gamma globale induit un syndrome inflammatoire périphérique, comme en témoigne l'augmentation du taux d'interleukine 6 (IL-6) circulante. Nous avons également précédemment observé *in vivo* chez le rat une chute précoce de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) striatale, dans les heures suivant l'irradiation. *In vivo*, l'injection d'IL-6 par voie intraveineuse ou intracérébro-ventriculaire induit une chute de l'activité AChE. *In vitro*, l'IL-6 n'a pas d'effet sur des neurones en culture, alors que l'on observe une diminution de la sécrétion enzymatique sur un modèle de co-culture neurone-glie. L'IL-6 peut donc moduler l'activité AChE centrale, vraisemblablement par l'intermédiaire de processus indirects.

#### INTERLEUKIN 6 MODULATES ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY OF BRAIN NEURONS

**ABSTRACT** – Classically, radiation injuries results in a peripheric inflammatory process, and we have previously observed an early systemic interleukin 6 (IL-6) release following whole-body irradiation. Besides, we have demonstrated an early decrease of rat or primate brain acetylcholinesterase (AChE) activity following a gamma exposure. The object of the present study is to find possible IL-6 systemic effects on the brain AChE activity. We show that, though intravenous (i.v.) or intracerebroventricular (ICV) injection of IL-6 can induce a drop in rat brain AChE activity, this cytokine induces only a slight decrease of the AChE release in cultured brain cells.

#### INTRODUCTION

La radiosensibilité fonctionnelle du SNC s'exprime, pour des doses de l'ordre de quelques grays, par des manifestations cliniques et paracliniques associant des anomalies électrophysiologiques, une activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, des troubles du comportement (anorexie, somnolence, modification du comportement exploratoire). La physiopathologie de ces troubles n'est pas encore parfaitement connue, mais ces anomalies peuvent évoquer l'action de cytokines de l'inflammation. En outre, un syndrome inflammatoire périphérique a été décrit après irradiation, avec augmentation de l'interleukine 6 (IL-6) circulante (1).

Au niveau neurochimique, nous avons observé une chute précoce de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) striatale *in vivo* chez le rat et chez le primate, après une irradiation gamma globale pour une gamme de doses de 10-15 Gy. Cette enzyme est alors considérée comme un marqueur fonctionnel du SNC après irradiation (des doses de plusieurs centaines de grays sont en effet nécessaires pour modifier *in vitro* l'activité de l'AChE).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet d'une administration d'IL-6 *in vivo* (injection périphérique ou centrale) et *in vitro* sur des cultures de neurones isolées ou associées à des cellules gliales.

#### MATÉRIELS ET MÉTHODES

##### Étude *in vivo*

L'étude de l'activité AChE striatale est réalisée par la technique de microspectrophotométrie *in vivo*, préalablement décrite (3). Les rats sont anesthésiés à l'hydrate de chloral (80 mg/kg/h, IV) et l'activité AChE est mesurée toutes les 35 minutes. L'IL-6 est admi-

nistrée par voie intra-veineuse à la dose de 870 µg/kg (n = 6); un groupe témoin (n = 5) reçoit le même volume d'une solution salée isotonique.

L'administration d'IL-6 par voie intra-cérébro-ventriculaire (ICV) est effectuée après mise en place d'une canule dans le ventricule latéral (ant : -0,3/bregma, lat. 2, haut. -4); 2 groupes de rats (n = 5) reçoivent soit l'IL-6 (200 ng/2 µl), soit l'excipient; pour cette dernière expérimentation, la sonde de microspectrophotométrie a été récemment modifiée (G. TESTYLIER, non publié) : un guide est implanté une semaine avant la mise en place de la sonde, ce qui permet de suivre l'activité AChE intra-cérébrale sur un animal non anesthésié.

#### Expérimentation *in vitro*

##### Cultures

Les mésencéphales d'embryons de souris OF1 (IFFA-CREDO) sont prélevés au 14<sup>e</sup> jour de la gestation. Les cellules sont dissociées par écrasement avec une baguette de verre sur un tamis à mailles de 40 µm (Falcon). Elles sont mises en culture dans un milieu défini : DMEM/F12 (1:1) additionné de progestérone ( $2 \cdot 10^{-8}$  M), insuline (25 µg/ml), putrescine ( $6 \cdot 10^{-5}$  M), transferrine (100 µg/ml), sélénite de sodium ( $3 \cdot 10^{-8}$  M), tri-iodothyronine (1 nM), b-œstradiol (1 pM), acide arachidonique (1 µg/ml) et acide docosahexaénoïque (0,5 µg/ml). Les cellules sont ensemencées à la densité de 300 000 par cm<sup>2</sup> dans des plaques de culture de 96 puits (TPP) préalablement couvertes de polyornithine (1,5 µg/ml) pendant une nuit. Les expérimentations sont réalisées sur des cultures âgées de 13 jours. Pour les cultures primaires de cellules gliales, les mésencéphales sont prélevés au 16<sup>e</sup> jour de gestation et mis en culture en milieu DMEM:F12 avec 10 % de sérum de veau fœtal.

##### Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase

L'activité de l'acétylcholinestérase est déterminée par la technique d'ELLMAN. Le milieu de culture est remplacé par du tampon PBS avec Ca<sup>++</sup> (1 mM), Mg<sup>++</sup> (1 mM) et glucose (6 mg/ml) plus IL-6 (0, 5, 50 et 500 ng/ml). L'activité enzymatique sécrétée dans le PBS pendant 2 ou 4 heures est mesurée séparément de celle du tapis cellulaire. La mesure de la densité optique est effectuée par un lecteur ELISA (Labsystem) à 405 nm, à raison de une mesure par minute pendant 10 minutes, à 37°C. L'activité enzymatique est exprimée en unités de densité optique par minute [(D.O./min) × 10<sup>3</sup>]. Chaque mesure est la moyenne de 6 puits de culture.

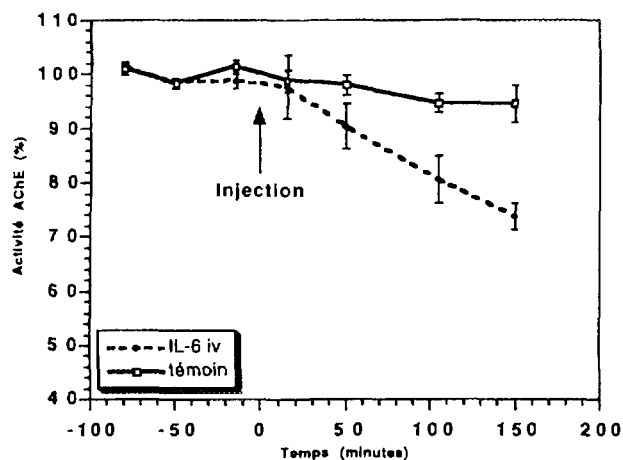


FIGURE 1 - Effet de l'injection IV d'IL-6 (870 µg/kg) sur l'activité AChE striatale (n = 6).

## RÉSULTATS

### In vivo

Une chute progressive de l'activité AChE est observable dès la 50<sup>e</sup> minute après l'injection intraveineuse d'IL-6; cette diminution de l'activité atteint 25 % après 2 h 30 (figure 1). Après injection intracérébrale d'IL-6, la diminution de l'activité enzymatique (12 %) est plus précoce (dès 20 minutes) et atteint un maximum d'inhibition (19 %) en une heure, sans retour aux valeurs témoins (figure 2).

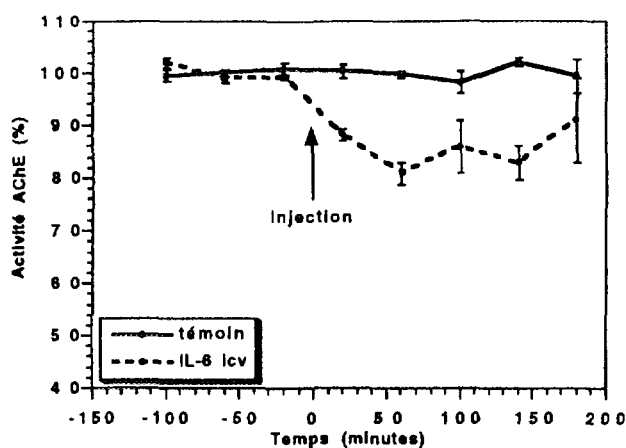


FIGURE 2 - Effet de l'injection ICV de 200 ng/2 µl d'IL-6 et du même volume d'excipient (n = 5 pour chaque groupe).

### In vitro

En vue de préciser l'origine de cette chute d'activité enzymatique observée *in vivo*, des cultures de neurones mésencéphaliques âgées de 13 jours *in vitro* ont été exposées pendant quelques heures à

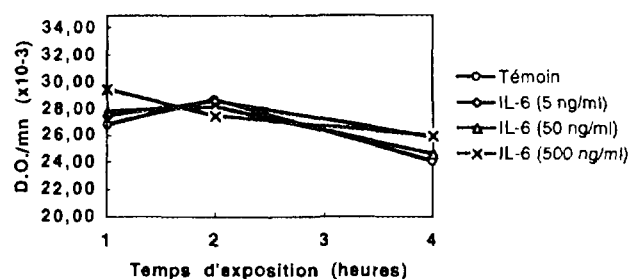


FIGURE 3 - Action de l'IL-6 sur l'AChE sécrétée par des neurones de mésencéphale *in vitro*.

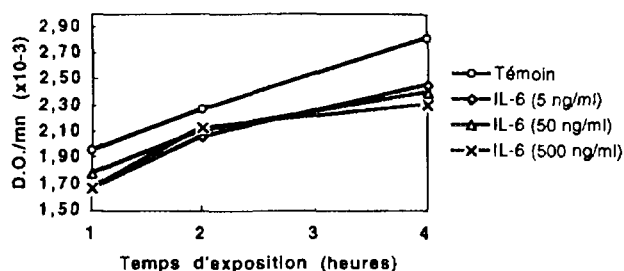


FIGURE 4 - Action de l'IL-6 sur l'AChE membranaire de neurones de mésencéphale *in vitro*.

l'IL-6. L'IL-6 (5 à 500 ng/ml) n'entraîne aucune variation de l'activité AChE. Par contre, si les neurones sont mis en co-culture avec des cellules gliales issues d'une culture primaire préalable, on observe une diminution de la sécrétion d'AChE dans le PBS (figure 3), sans modification de l'activité liée aux membranes (figure 4). Cette diminution est indépendante de la concentration d'IL-6 et s'observe dès la première heure d'exposition.

## DISCUSSION

L'effet des cytokines sur le système cholinergique est encore peu documenté: RADA a montré une diminution du contenu extra-cellulaire en acétylcholine au niveau de l'hippocampe (2), mais aucune étude sur les effets de l'IL-6 sur l'AChE n'a été réalisée *in vivo*.

Les expérimentations rapportées ici montrent que l'injection intra-veineuse d'IL-6 induit une chute rapide de l'activité AChE, sans réactivation durant les 3 heures suivantes. L'injection intra-cérébrale entraîne un effet identique mais après un délai plus court. Ces résultats observés *in vivo* montrent que l'IL-6 pourrait jouer un rôle modulateur sur l'activité AChE.

*In vitro*, la diminution de la sécrétion d'enzyme n'est observée qu'en présence de cellules gliales. Ceci suggère que les mécanismes mis en jeu font intervenir des interactions cellulaires.

*In vivo*, des régulations à un degré d'intégration supérieur sont possibles. En effet, l'activité de l'enzyme sécrétée *in vitro* ne représente qu'une petite fraction de l'activité mesurée au niveau membranaire. La diminution de cette activité sécrétée ne peut donc pas expliquer à elle seule la chute de 20 % observée *in vivo* (l'activité mesurée *in vivo* est la somme des activités externes, membranaires et libre).

Ces observations sont en faveur d'une participation du syndrome inflammatoire radio-induit dans la genèse des troubles neurophysiologiques du syndrome initial de l'irradiation aiguë.

(C.R.S.S.A., La Tronche - Grenoble)

## RÉFÉRENCES

- 1 F. HÉRODIN *et al.* - Recombinant glycolylated human interleukin-6 accelerates peripheral blood platelet count recovery in radiation-induced bone marrow depression in baboons, *Blood*, 1992, 80, 3, 688-695.
- 2 P. RADA - Interleukin-1 beta decreases acetylcholine measured by microdialysis in the hippocampus of freely moving rats, *Brain Research*, 1991, 550, 287-290.
- 3 G. TESTYLIER and P. GOURMELON - Spectrophotometry *in vivo*, a technique for local and direct enzymatic assays: application to brain acetylcholinesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 8145-8149.